

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

2 Offenlegungsschrift
10 DE 41 20 345 A 1

21 Aktenzeichen: P 41 20 345 3
22 Anmeldetag: 19 8 91
43 Offenlegungstag: 24 12 92

51 Int. Cl. 5
C 07 K 15/04
C 07 H 21/04
C 07 K 15/28
G 01 N 33/569
C 12 P 21/06
C 12 Q 1/00

DE 41 20 345 A 1

71 Anmelder:
Vogt, Arnold, Prof. Dr. med., 7800 Freiburg, DE

72 Erfinder:
Rasiah, Christiane, Dipl.-Biol., 7800 Freiburg, DE;
Gaßmann, Gabriele, Dipl.-Biol. Dr., 7801 Ebringen,
DE; Vogt, Arnold, Prof. Dr. med., 7801 Bollschweil,
DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 39 42 728 C1
WO 91 09 870

LIN, T. M.:
et al.: Medline: 92042775, J. Immuno-assay, 1991,
12(3), S. 325-46;
BERLAND, R.:
et al.: Medline: 91372981,
Infect. Immun., 1991, 59 (10) S. 3531-5;
Chemical Abstracts: Vol. 115, 1991, Ref. 178916j,
Vol. 115, 1991, Ref. 107233y,
Vol. 114, 1991, Ref. 18153j,
Vol. 111, 1989, Ref. 147567j.

54 Proteinfragmente aus dem mittleren Bereich des Flagellins von *Borrelia burgdorferi*, geeignet als Antigene
zum spezifischen Antikörpernachweis sowie Verfahren zu ihrer Herstellung

DE 41 20 345 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Gewinnung Borrelien-spezifischer Antigenfragmente aus dem mittleren Bereich des Flagellins von *Borrelia burgdorferi*, die als Antigene für einen empfindlichen und spezifischen Antikörperrnachweis zur Erkennung der durch Zecken übertragenen Borreliose (Lyme-Borreliose) geeignet sind.

Der Erreger *Borrelia burgdorferi* verursacht beim Menschen eine multisystemische Infektion mit vielfältigen Krankheitserscheinungen. Die Infektion kann die Haut (Erythema chronicum migrans, Acrodermatitis chronica atrophicans), das Nervengewebe (Polyradiculitis, Meningoenzephalitis, Facialisparesie), die Gelenke (Monoarthritis) und das Herz (Reizleitungsstörungen) betreffen. Die Isolierung des Erregers ist schwierig und gelingt nur selten. So beruht die Labordiagnostik auf dem Nachweis spezifischer Antikörper.

Stand der Technik

Gebräuchliche Verfahren sind die indirekte Immunfluoreszenz und verschiedene Anordnungen von Enzymimmunoassays. Als Antigen verwendet werden entweder ganze Zellen oder Ultrasonikate von *Borrelia burgdorferi*. Durch Auswahl bzw. Anreicherung immundominanter Antigene wie gereinigter Flagellen (Geißeln) von *Borrelia burgdorferi* (Hansen et al., J. Clin. Microbiol. 26:338-346, 1988; Hansen et al., J. Clin. Microbiol. 29:166-173, 1991) und einer mit Flagellin angereicherten Antigenpräparation (Magnarelli et al., J. Infect. Dis. 159:43-49, 1989) konnte die Spezifität der serologischen Testverfahren verbessert werden.

Kritik am Stand der Technik

Die bisherigen Tests sind noch unbefriedigend sowohl hinsichtlich Sensibilität als auch Spezifität. Die in der Frühphase schwache Immunantwort wird mit diesen Tests nicht sicher erfaßt, es resultieren relativ viel falsch negative Reaktionsausfälle. Die geringe Spezifität zeigt sich daran, daß in der Normalbevölkerung ein relativ hoher Prozentsatz erhöhter Antikörpertiter gefunden wird, die nicht mit klinischen Erscheinungen der Lyme-Borreliose in Zusammenhang gebracht werden können. Ursache hierfür sind offensichtlich kreuzreagierende Antikörper, die durch saprophytische Spirochäten oder andere Bakterien hervorgerufen werden, die Antigengemeinschaften mit *Borrelia burgdorferi* aufweisen, wie z. B. das immundominante 60 KD Protein von *B. burgdorferi*, das als "Common Antigen" bei einer Vielzahl von Bakterien vorhanden ist (Hansen et al., Infect. Imm. 56:2047-2053, 1988). Kreuzreaktionen sind daher vor allem bei der Verwendung von Ultrasonikaten oder ganzen Zellen zu beobachten. Jedoch auch bei Verwendung von *B. burgdorferi* Flagellin oder mit Flagellin angereicherter Antigenpräparationen hat sich herausgestellt, daß der Nachweis von Antikörpern gegen das Flagellin im Immunblot keine hohe Spezifität besitzt (Zöller et al., J. Clin. Microbiol., 29:174-182, 1991). Da Flagelline aufgrund ihrer Funktion stark konservierte Proteine darstellen, beruht die geringe Spezifität auf Homologien zwischen den Flagellinen unterschiedlicher Bakterienspezies, mit denen sich das Immunsystem des Menschen auseinanderzusetzen hat.

Die Identifizierung Borrelienspezifischer Epitope (umschriebene, mit spezifischen Antikörpern reagierende kleine Bezirke auf dem Antigen) und die Isolierung von Teilstücken des Flagellins, die sowohl immundominant als auch Borrelienspezifisch sind, sollte zu einem spezifischeren und auch empfindlicheren Test führen. Die Sensitivität wird dadurch erhöht, daß durch das Eliminieren kreuzreagierender Epitope bei der Verwendung *B. burgdorferi*-spezifischer Fragmente im Testverfahren im Vergleich zum intakten Flagellin mehr spezifische Epitope angeboten werden können. Durch die Reduktion unspezifischer Bindungen wird der Unterschied zwischen positiv und negativ eines Testes erhöht.

Das Flagellin von *Borrelia burgdorferi* (die Flagellen von *B.b.* besitzen nur einen Typ von Flagellin) wurde kloniert, die DNA sequenziert und die Aminosäuresequenz des Flagellins daraus abgeleitet. Die Identität des Proteins wurde durch Sequenzanalyse einiger tryptischer Peptide des aus *Borrelia burgdorferi* isolierten Flagellins bestätigt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Flagellins von *Borrelia burgdorferi* mit der von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* und *Treponema pallidum* ergab Homologien über große Bereiche an jeweils beiden Enden der Flagellinmoleküle. Die hiernach zu erwartende Kreuzantigenität zwischen Flagellinen nicht verwandter Bakterienspezies konnte experimentell bestätigt werden. Antiseren von Kaninchen, die mit gereinigten Flagellen von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* oder *Proteus mirabilis* immunisiert worden waren, reagierten im ELISA und Westernblot deutlich mit dem Flagellin von *Borrelia burgdorferi*. Umgekehrt erkannten Antiseren von Kaninchen, die mit dem Flagellin von *Borrelia burgdorferi* immunisiert worden waren, die Flagelline von *Treponema phagedenis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* und *Proteus mirabilis*.

Ein weiterer Kritikpunkt praktischer Art ist die Tatsache, daß die Isolierung von Flagellen oder auch von Flagellin aus in der Kultur vermehrten *B. burgdorferi* arbeitsaufwendig und kostenintensiv ist (Ultrazentrifugation, Dichtegradienten). Vorteilhafter ist, als Ausgangsmaterial für die Gewinnung spezifischer Fragmente rekombinantes Flagellin zu verwenden. Des weiteren neigt Flagellin von *B. burgdorferi*, konventionell isoliert oder als rekombinantes Protein hergestellt, in wäßrigen Lösungen zur Aggregation, das Protein bleibt nur in Urea- oder Detergenz-haltigen Puffern in Lösung. Kleinere Fragmente dagegen sollten wasserlöslicher sein; dies ist ein Vorteil, wenn man unlösliche Träger, wie z. B. Mikrotiterplatten, in reproduzierbarer Weise mit

Antikörpern beschichten und die Antigene in Form von Antikörper-Antigen-Komplexen auf der Platte immobilisieren.

B.burgdorferi Flagellins eine Verbesserung der Serologie hinsichtlich Spezifität und Sensitivität zu erreichen.

Eine Epitopanalyse mit überlappenden Oktapeptiden des gesamten Flagellinmoleküls von B.burgdorferi ergab, daß die heterologen kreuzreagierenden Antiseren gegen Epitope am Amino-terminalen Bereich (bis AS 131) und am Carboxy-terminalen Bereich (von AS 267 bis zum Ende des Moleküls AS 336) gerichtet waren. Epitope des variablen mittleren Teiles wurden von Antiseren erkannt, die durch Immunisierung mit Antigenpräparationen erhalten wurden, die *Borrelia burgdorferi*-Flagellin enthielten. Antiseren, die nur Epitope aus dem mittleren Teil des *Borrelia burgdorferi*-Flagellins (AS 132 bis AS 266) erkannten, reagierten zwar mit Flagellin von *Borrelia hermsii*, aber nicht mit Flagellinen von *Treponema phagedenis*, *Bacillus subtilis* oder *Escherichia coli* im Immunoblot. *Borrelia hermsii*, Erreger von Zeckenrückfallfieber, spielt in Europa keine Rolle.

Eine starke Häufung der Borrelienspezifischen Epitope fand sich zwischen den Aminosäuren 209 und 227.

Aus diesen gewonnenen Erkenntnissen bietet sich die Verwendung eines Fragmentes aus dem mittleren Flagellinbereich als spezifisches Antigen an. Das Flagellin steht als rekombinantes, Nichtfusionsprotein in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Verwendung von Fusionsproteinen, die Bereiche des mittleren Teils des Flagellins von *Borrelia burgdorferi* entsprechen, ist nicht naheliegend, da nach Collins und Peltz (Collins, C. and Peltz, G., 1991, Inf. Immun. 59, 514 – 520) die Immunantwort der Lyme-Borreliose-Patienten ausschließlich gegen die konservierten Bereiche des Flagellins gerichtet sein soll. Unsere Ergebnisse mit Epitopen aus dem mittleren Teil des Flagellins widerlegen diese Aussage.

Lösung der Aufgabe

Ein Fragment des mittleren Bereiches wurde durch proteolytischen Verdau des rekombinanten Flagellins erhalten. Als eine geeignete Protease erwies sich Trypsin, das einen großen Teil des mittleren Bereiches des Flagellins intakt läßt. Mit *Staphylococcus aureus* Protease V8 wird der variable Teil des Flagellins in zu viele kleine Bruchstücke zerlegt; es konnte kein Borrelien-spezifisches Fragment identifiziert werden. Es ist allerdings denkbar, daß andere Proteasen, sowie die chemische Spaltung mit Cyanbromid, ebenfalls erfolgreich verwendet werden können. Nach der Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-Gel-Elektrophorese führt die Trypsinspaltung zu einem 14KD großen Fragment. Durch N-terminale Sequenzierung und Aminosäureanalysen des gereinigten 14KD-Fragments konnte die genaue Zuordnung zum mittleren Bereich ermittelt werden. Das 14KD-Fragment reicht von AS 175 bis AS 252 (tatsächliches MG 8,5KD) und liegt im Bereich der variablen Region (AS 132 – AS 266), die auch die meisten Borrelienspezifischen Epitope (AS 209 bis AS 227) trägt. Im Immunoblot und ELISA zeigte das Fragment im Gegensatz zum intakten Flagellin keinerlei Kreuzreaktionen mit Kaninchen-Hyperimmunseren, die gegen Flagellen von *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema phagedenis* und *Proteus mirabilis* gerichtet waren. Schwache Kreuzreaktionen ergaben sich mit Kaninchenhyperimmunseren gegen *Borrelia hermsii*, *Borrelia tunicatae* und mit *Borrelia parkeri*.

Letztere sind die Erreger der in Nordamerika vorkommenden Formen des Rückfallfiebers; sie sind in Europa von geringer Bedeutung. Im Vergleich zum gesamten Flagellin hat ein Fragment aus dem Borrelienspezifischen mittleren Bereich zwei wesentliche Vorteile: es macht den Antikörpernachweis zum einen spezifischer, zum anderen auch sensitiver. Nur durch eine Borrelieninfektion selbst hervorgerufene Antikörper reagieren mit dem Fragment, nicht aber kreuzreagierende Antikörper. Die in europäischen Laboratorien geübte vorherige Absorption der Patientenseren mit Kulturspirochäten wie *Treponema phagedenis*, um die kreuzreagierenden Antikörper zu entfernen, eliminiert nach unseren Erfahrungen nur einen Teil dieser störenden Antikörper. Sie ist effektiv bei Luesantikörpern, jedoch ungenügend bei Vorliegen anderer kreuzreagierender Antikörper. Testung von mit *Treponema phagedenis* absorbierten Humansen im IgG-ELISA reduzierte eine vorhandene Reaktion gegen Flagellen von *E. coli* und *Bacillus subtilis* (und auch gegen *Borrelia burgdorferi*) nicht signifikant.

Im folgenden sei beispielhaft die Gewinnung des tryptischen 14KD Fragmentes geschildert:

Isolierung des rekombinanten Flagellins

Der mit dem das Flagellin tragende Plasmid (pBb20) transformierte *Escherichia coli* Stamm HB101, der ein Nichtfusionsprotein exprimiert, wird in 5 L Herz-Hirn Bouillon, 0,1 mg Ampicillin/ml enthaltend, für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien (ca. 10 g Feuchtgewicht) werden in 100 ml 8M Urea (in 20 mM Imidazol pH 6,5) aufgenommen und in einem 200 ml Erlenmeyerkolben auf dem Magnetrührer für zwei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wird der Extrakt für 30 Minuten zentrifugiert und mit dem Überstand (Urea-Extrakt) direkt eine DEAE-Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die DEAE-Zellulose ist in 8M Urea äquilibriert. Die hochmolekularen Verunreinigungen sowie DNA und RNA werden von der Säule zurückgehalten, das rekombinante Flagellin erscheint im Ausschlußvolumen. Nach Dialyse gegen Aqua bidest – das Flagellin aggregiert – wird das ausgefallene Protein in 50 mM MES und 8M Urea, pH 6,5 gelöst und über einen Kationenaustauscher chromatographiert. Das rekombinante Flagellin bindet unter diesen Bedingungen an den Kationenaustauscher und eluiert im kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0 – 1M NaCl). Das Flagellin ist bis auf geringe Verunreinigungen mit niedermolekularen Peptiden (< 30KD) sauber. Letztere stören im ELISA oder im Westernblot nicht. Die Ausbeute an gereinigtem Flagellin beträgt insgesamt 12 – 16 mg pro 5 L Kultur.

zugegeben und bei 37°C für mindestens vier Stunden inkubiert. Die Inkubation des 14KD Proteins

erfolgt über FPLC-Gelfiltration. Die Ausbeute an 14KD-Fragment beträgt ca 3–6 mg (von der 5 L *Escherichia coli* Kultur). Es ist im SDS-Gel frei von Verunreinigungen.

Ausführungsbeispiel für den Nachweis von Borrelienspezifischen Antikörpern im Festphasen-ELISA mit dem rekombinanten Flagellin und dem 14KD-Protein als Antigen

Das rekombinante Flagellin und das 14KD-Fragment wurden im folgenden als Antigene in einem Festphasen-ELISA zum Nachweis von IgG getestet.

Gereinigtes rekombinantes Flagellin und isoliertes 14KD-Fragment wurden in einer Konzentration von 0,25 µg/ml bzw. 0,5 µg/ml in 0,05M Carbonatpuffer pH 9,6 aufgenommen. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatten werden 100 µl gegeben und die Platten über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die Antigen beschichteten Platten werden mit üblichem Waschpuffer, enthaltend 0,2% Tween 20 in PBS, 5 x gewaschen.

Bei – 20°C halten sich die Platten mehrere Monate lang. Die Ergebnisse des ELISA sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

Die mit intaktem Flagellin im ELISA nicht selten gefundenen erhöhten Antikörpertiter in Seren von Nicht-Borreliose-Patienten sind mit dem 14KD-Fragment nicht zu beobachten (Tab. 1). Alle 14 Kontrollseren von Nicht-Borreliose-Patienten waren im ELISA mit dem 14KD-Fragment negativ, während einige falsch positive Reaktionsausfälle mit dem intakten Flagellin auftraten (42%).

Die Möglichkeit, im Test nur Borrelienspezifische Bereiche des Flagellins als Antigen anzubieten, macht den Test auch empfindlicher. Im ELISA hängt, wie leicht einzusehen ist, die Menge der spezifischen Antikörper, die gebunden werden können, von der Antigenmenge ab, mit der die Festphase (Vertiefung der Mikrotiterplatte) beschichtet werden kann. Der mittlere Borrelienspezifische Bereich (AS 132 bis AS 266) macht etwa 38% des aus 336 Aminosäuren bestehenden Gesamtmoleküls aus. Bei Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem mittleren Fragment statt mit dem gesamten Flagellinprotein dürften sich rechnerisch etwa 2,6mal mehr Borrelienspezifische Antikörper binden. Unter der Annahme, daß alle Borrelienspezifischen Antikörper vom tryptischen 14KD-Fragment erfaßt werden, würde die Empfindlichkeit um den Faktor 3 zunehmen. In der Realität ist die Zunahme der Sensibilität z. T. noch günstiger (Tab. 2). Im ELISA sind die erzielten Antikörpertiter um 1 bis 4 geometrische Titerstufen höher, wenn man statt des gereinigten Flagellins das gereinigte 14KD-Fragment als Antigen verwendet.

Insgesamt schneidet der ELISA mit dem 14KD-Fragment als Testantigen wesentlich besser ab als bei Verwendung des intakten Flagellins (Tab. 2). Von den 30 Seren werden mit dem rekombinanten Flagellin als Antigen 18 (60%) als positiv erkannt, mit dem 14KD-Fragment dagegen 27 (90%).

Im Vergleich mit dem intakten Flagellin ist der Test bei Verwendung des 14KD-Fragmentes sowohl spezifischer als auch sensitiver.

Für den Einsatz als Antigen, z. B. im ELISA, ist es nötig, das 14 KD-Fragment nach dem Verdau des Flagellins zu reinigen, um kreuzreagierende kleine Peptide des Flagellins und Kontaminationen mit Fragmenten von *E. coli* Proteinen zu entfernen. Dies gelingt zuverlässig mittels Gelfiltration.

Eine Kombination des 14KD-Fragmentes mit anderen Borrelien- aber Nicht-Flagellin-Antigenen, wie dem 94/100KD-, dem 34KD-, dem 31KD- und 21KD-Protein, gegen die in der Spätphase der Infektion (Acrodermatitis chronica atrophicans, Arthritis) häufiger Antikörper gebildet werden, könnte zu einer weiteren Verbesserung eines Borrelienspezifischen Antikörpernachweises führen. Voraussetzung wäre, daß die verwendeten Antigene Borrelienspezifisch und frei von Kreuzreaktionen mit Proteinen anderer Bakterien sind, was noch zu prüfen ist.

Die Gewinnung von ausreichenden Mengen an 14KD-Fragment oder anderer Fragmente aus dem mittleren Bereich durch Verdau des rekombinanten Flagellins und die anschließende Reinigung ist mit einem zumutbaren Arbeitsaufwand verbunden. Ökonomischer könnte es sein, entsprechende Genstücke zu klonieren und Antigenfragmente als rekombinante Proteine zu exprimieren. Dabei wären Nichtfusionsproteine oder Fusionsproteine mit einem Abstandshalter (linker) reinen Fusionsproteinen vorzuziehen. Ein Fusionsprotein des gesamten variablen mittleren Bereiches erkannte im Immunoblot weniger Borrelienspezifische Antikörper als das tryptische 14KD-Fragment.

Der Antikörpernachweis mit dem tryptischen 14KD-Fragment kann im ELISA ohne weiteres klassenspezifisch in der sogenannten Festphasenanordnung durchgeführt werden. Für den IgM-Antikörpernachweis muß lediglich das Patientenserum vorher mit RF-Absorbens behandelt werden, um störende Rheumafaktoren zu entfernen. Eine andere Möglichkeit ist, die isolierte IgM-Fraktion des Serums zu verwenden oder in einem sog. IgM capture-Test zunächst die IgM-Globuline des Patientenserums selektiv zu binden, dann das Antigenfragment direkt anzubieten (biotinyliert oder nicht biotinyliert) und in einem weiteren Schritt entweder mit einem Enzym-markierten Antikörper oder mit Enzymmarkiertem Avidin den Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern zu führen.

Tabelle 1

IgG-ELISA

Nachweis von Borrelienspezifischen Antikörpern bei Verwendung des gereinigten rekombinanten Flagellins
bzw. des Flagellinfragments

negative Kontrollseren

	rek. Flagellin	14 KD- Fragment	Bemerkungen	
1	4,0	1,5	Parodontose	10
2	0,4	0,5	Parodontose	15
3	0,9	0,8	Parodontose	
4	0,4	1,4	Lues	
5	0,9	0,1	Lues	
6	0,7	0,4	Lues	
7	0,3	0,1	Lues	20
8	1,4	0,2	Lues	
9	0,6	0,3	Kontrollserum	
10	0,9	0,4	Kontrollserum	
11	0,3	0,1	Kontrollserum	
12	0,7	0,6	Kontrollserum	25
13	1,7	0,4	Kontrollserum	
14	2,7	0,6	Kontrollserum	
15	1,4	0,4	Kontrollserum	
16	0,8	0,2	Kontrollserum	
17	4,4	0,3	Kontrollserum	30
18	0,5	0,1	Kontrollserum	
19	0,3	0,6	Kontrollserum	
20	4,6	0,9	Kontrollserum	
21	4,9	0,9	Kontrollserum	
22	5,7	0,8	Kontrollserum	35

Units = (OD von 1400 Verdünnung der Patientenseren) \times 3

positiv > 1,5 units

grenzwertig = 1,0 – 1,4 units

negativ < 1,0 units

Tabelle II

IgG ELISA

5 Nachweis von Borrelienspezifischen Antikörpern bei Verwendung des gereinigten rekombinanten Flagellins
bzw. des 14KD-Flagellinfragments

positive Seren

10		rek. Flagellin	14 KD- Fragment	Bemerkungen
	1	2,0	> 6,0	ACA
15	2	1,4	2,0	Verd. a. Borreliose
	3	1,7	5,1	ECM
	4	1,4	4,6	ECM
	5	4,0	5,6	Arthritis
	6	3,7	0,9	ACA
20	7	1,1	3,5	Facialispar.
	8	> 6,0	> 6,0	Arthritis
	9	4,1	5,5	Neuroborreliose
	10	4,0	> 6,0	Verd. a. Borreliose
	11	3,3	> 6,0	Verd. a. Borreliose
25	12	3,9	> 6,0	Arthritis
	13	0,4	0,2	ECM
	14	2,8	4,1	Radiculitis
	15	2,9	3,8	Radiculitis
	16	1,0	3,6	Verd. a. Borreliose
30	17	0,5	2,1	Verd. a. Borreliose
	18	0,5	2,5	Bannwarth
	19	2,0	> 6,0	Verd. a. Borreliose
	20	1,6	4,8	ACA
	21	3,0	> 6,0	Arthritis
35	22	5,8	> 6,0	Neuroborreliose
	23	1,1	2,3	Facialispar. Neurob.
	24	2,6	> 6,0	Facialispar.
	25	> 6,0	3,1	Verd. a. Borreliose
	26	0,9	3,2	ECM
40	27	0,9	1,4	Verd. a. Borreliose
	28	0,7	1,5	Verd. a. Borreliose
	29	1,1	3,3	Verd. a. Borreliose
	30	> 6,0	> 6,0	Verd. a. Borreliose

Units = (OD bei 1 : 400 Verdünnung der Patientenserum) x 3
 positiv > 1,5 units
 grenzwertig 1,0—1,4 units
 negativ < 1,0 units

Patentansprüche

1. Proteinfragmente aus dem mittleren Bereich (Aminosäure 132 bis Aminosäure 266) des Flagellins von *Borrelia burgdorferi*, dadurch gekennzeichnet, daß die resultierenden Proteinfragmente des Flagellins kodierende DNA-Sequenz mit der folgenden DNA-Sequenz hybridisiert:

AAATGCACAT GTTATCAAAAC AAATCTGCTT CTCAAAATCT AAGAACAGCT
 GAAGAGCTTG GAATGCAGCC TGCAAAAATT AACACACCAG CATCGCTTTC 5
 AGGGTCTCAA GCGTCTTGA CTTTAAGAGT TCATGTTGGA GCAAACCAAG
 ATGAAGCTAT TGCTGTAAAT ATTTATGCAG CTAATGTTGC AAATCTTTTC
 TCTGGTGAGG GAGCTCAAAAC TGCTCAGGCT GCACCGGTTT AAGAGGGTGT 10
 TCAACAGGAA GGAGCTCAAC AGCCAGCACC TGCTACAGCA CCTTCTCAAG
 GCGGAGTTAA TTCTCCTGTT AATGTTACAA CTACAGTTGA TGCTAATACA
 TCACTTGCTA AAATTGAAAA TGCTATTAGA ATGATAAGTG ATCAAAGAGC 15
 AAAT

2. Verfahren zur Herstellung von Proteinfragmenten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch proteolytische oder chemische Spaltung des Flagellins von *Borrelia burgdorferi* ein Fragment aus dem mittleren Borrelien-spezifischen Bereich (AS 132 bis AS 266) gewonnen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinantes *Borrelia burgdorferi* Flagellin (Nichtfusionsprotein) als Ausgangsprotein für die Spaltung verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß Trypsin als Protease verwendet wird, wobei ein 14KD-Fragment mit der folgenden Aminosäuresequenz resultiert:

Val His Val Gly Ala Asn Gln Asp Glu Ala Ile Ala Val Asn Ile Tyr Ala Ala Asn Val Ala Asn Leu Phe Ser Gly
 Glu Gly Ala Gln Thr Ala Gln Ala Ala Pro Val Gln Glu Gly Val Gln Gln Glu Gly Ala Gln Gln Pro Ala Pro
 Ala Thr Ala Pro Ser Gln Gly Val Asn Ser Pro Val Asn Val Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Ser Leu Ala Lys 30

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2–4, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteinfragmente als rekombinante Nicht-Fusionsproteine hergestellt werden.
6. Verwendung der Proteinfragmente nach Anspruch 1 als Antigene zum labordiagnostischen Nachweis von spezifischen Antikörpern bei der Lyme-Borreliose.
7. Verwendung der Proteinfragmente gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Fragment (die Fragmente) allein oder zusammen mit anderen Borrelienspezifischen Antigenen an unlösliche Träger gebunden, Verdünnungen von Patientenserum angeboten und die Bindung der darin enthaltenen Antikörper an das Testantigen bestimmt oder das lösliche Fragment in wäßriger Phase vorher aus dem Patientenserum selektierten klassenspezifischen Antikörpern angeboten und anschließend das Ausmaß der Bindung des Fragments an die klassenspezifischen Antikörper direkt bzw. indirekt gemessen wird.
8. Verwendung nach Anspruch 6 und/oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger für das Testantigen mikroporöse Membranen (Nitrozellulose, Nylon, Polyomylidene diffuioide etc), Filterpapier, Mikrotiterplatten, Plastikröhrchen, Latex-Partikel, Gelatinepartikel, Erythrozyten, verwendet werden.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Borrelienspezifischen Antikörper klassenspezifisch und quantitativ erfolgt.
10. Verwendung der Proteinfragmente gemäß den Ansprüchen 6–9 als Reagenzkit zur Bestimmung von gegen das Testantigen gerichteten Antikörpern in wäßrigen Testproben, gekennzeichnet durch ein erstes Reagenz, bestehend aus einem unlöslichen Polymer, an das das Testantigen gebunden ist, ein zweites Reagenz, bestehend aus einem Enzym-markierten Anti-Human Ig (Anti-IgG, -IgM, -IgA, -IgE) und ein drittes Reagenz, bestehend aus einem geeigneten Substrat für das verwendete Enzym.
11. Verwendung der Proteinfragmente gemäß den Ansprüchen 6–9 als Reagenzkit zur Bestimmung von gegen das Testantigen gerichteten Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß ein erstes Reagenz aus einem unlöslichen Polymer, an dem Anti-Human IgM-Antikörper gebunden sind, besteht, einem zweitem Reagenz, das aus löslichem Testantigen besteht, einem dritten Reagenz, das aus Enzymmarkierten Antikörpern spezifisch für das Testantigen besteht und einem vierten Reagenz, bestehend aus einem geeigneten Substrat für das Enzym, mit dem das Antiserum markiert ist.
12. Verwendung der Proteinfragmente als Reagenzkit nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß statt des zweiten Reagenz direkt lösliches Enzymmarkiertes oder biotinyliert Testantigen angeboten werden und das Ausmaß des gebundenen Antigens durch ein drittes Reagenz, bestehend aus einem geeigneten Substrat, anschließend quantifiziert werden kann.
13. Verwendung der Proteinfragmente als Reagenzkit nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eines oder mehrere der Reagenzien lyophilisiert sind.